doi:10.11751/ISSN.1002－1280.2021.4.05

HPLC 法测定天然植物粗提物中芍药苷含量

杜西翠[1,2],李云波[3],张 趁[4],郭艳钦[1],徐 丹[5],刘格格[1],王梦雪[6],李淑娜[7],朱秋艳[7]

(1. 河北锦坤动物药业有限公司,辛集 052360; 2. 辛集市中兽药技术创新中心,辛集 052360; 3. 河北省兽用中药制剂技术创新中心,辛集 052360; 4. 河北省农业创新驿站,辛集 052360; 5. 河北省饲用天然植物提取物产业技术创新战略联盟,辛集 052360; 6. 石家庄市汇丰动物保健品有限公司,辛集 052360; 7. 乐亭县农业农村局,唐山 063600)

[收稿日期] 2020－09－02　[文献标识码]A　[文章编号]1002－1280 (2021) 04－0039－05　[中图分类号]S853.7

[摘　要]　建立高效液相色谱法检测天然植物粗提物饲料原料中芍药苷的测定方法。用十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱,以乙腈－0.1% 磷酸溶液(14∶86)为流动相,检测波长 230 nm,流速:1.0 mL/min;柱温:30 ℃;进样量:10 μL。结果显示:在 20～200 μg/mL 范围内,芍药苷的线性方程为 $Y=10.6017X-14.8514$,($r=0.99966$,$n=6$),本方法的回收率为 100.4～102.1%,*RSD* 均小于2.0%。结果表明,本方法准确,可靠,适用于天然植物粗提物饲料原料中芍药苷的测定。

[关键词]　HPLC;天然植物粗提物;饲料原料;芍药苷

Determination of Paeoniflorin in Natural Plant Crude Extract Feed Materials by HPLC

DU Xi－cui[1,2],LI Yun－bo[3],ZHANG Chen[4],GUO Yan－qin[1],XU Dan[5],LIU Ge－ge[1], WANG Meng－xue[6],LI Shu－na[7],ZHU Qiu－yan[7]

(1. *Hebei Jinkun Animal Pharmaceutical Co. LTD*,*Xinji* 052360,*China*; 2. *Xinji Veterinary medicine Technology Innovation Center*, *Xinji* 052360,*China*; 3. *Hebei Veterinary Medicine Preparation Technology Innovation Center*,*Xinji* 052360,*China*; 4. *Hebei Province Agricultural Innovation Post*,*Xinji* 052360,*China*; 5. *Industrial technology Innovation strategic Alliance of Forage natural plant extracts in Hebei Province*,*Xinji* 052360,*China*; 6. *Shijiazhuang Huifeng Animal Health Products Co. LTD*,*Xinji* 052360,*China*; 7. *Bureau of agriculture and rural areas of the laoting county*, *Tangshan* 063600,*China*)

Abstract: To establish a HPLC method for the determination of paeoniflorin in the crude extracts of natural plants. The mobile phase was acetonitrile－0.1% phosphoric acid solution (14∶86), the detection wavelength was 230 nm, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 10 μL. The results showed that the linear equation of paeoniflorin was $Y=10.6017X-14.8514$, ($r=0.99966$, $n=6$). The recoveries of paeoniflorin were 100.4 ～ 102.1%, *RSD* were less than 2.0%. The results showed that the method was accurate and reliable, and could be used for the determination of paeoniflorin in feed materials of natural plant crude extract.

Key words: HPLC; crude extract of natural plants; feed material; paeoniflorin

---

基金项目:河北省人才工程培养资助项目(A201901135)

作者简介:杜西翠,硕士,兽医师,中兽药产品研发。E－mail:duxicui0320@163.com

针对目前畜牧养殖业中滥用抗生素导致的药物残留和细菌耐药性等问题[1]，研究团队开发出一款既可以代替抗生素使用又可以提高动物机体免疫力的新型饲料原料"黄芪白芍粗提物"。本产品是由黄芪、白芍等中药材提取加工制备而成的天然植物粗提物，可以用于畜禽生长的各个阶段，能够有效减少临床上抗生素的使用。为了控制产品的质量，保证产品稳定、有效，研究并测定其有效活性成分的含量具有非常重要的意义。

白芍收载于《中国兽药典》2015 年版二部，为毛茛科植物芍药的干燥根，气微，味微苦、酸。具有平肝止痛，养血敛阴的功效，主治肝阴不足，虚热，泻痢腹痛，四肢拘挛[2]。兽医临床中经常与当归、熟地、桂枝、白术、甘草等配伍使用，用于治疗血虚、阴虚、疼痛等病症，具有很高的临床应用价值。主要含有芍药苷、羟基芍药苷及芍药内酯苷、苯甲酰芍药苷，以及苯甲酸、鞣质、挥发油、脂肪油、树脂、糖、黏液质、蛋白质、β－谷甾醇、草酸钙、芍药碱、牡丹酚及三萜类化合物等成分[3-4]。黄芪是豆科植物蒙古黄芪或膜荚黄芪的干燥根是一种传统的中药材，具有补气升阳，固表止汗，利水消肿，生津养血，行滞通痹，脱毒排脓，敛疮生肌的功能[5]。现代研究表明，黄芪含皂苷、蔗糖、多糖、多种氨基酸、叶酸及硒、锌、铜等多种成分，其中黄芪多糖是黄芪的主要有效成分[6]。经查阅文献[7-9]，黄芪多糖的含量多采用紫外分光光度法进行测定且组方为单一黄芪成分。复方产品进行黄芪多糖含量测定试验缺乏专属性，而进行黄芪甲苷测定则需要用到不常用的蒸发光散射检测器且含量较低不易检测。因此，本试验以芍药苷为测定指标，测定了黄芪白芍粗提物中芍药苷的含量，对于控制产品质量和完善标准具有实用性。

1　仪器与试药

1.1　仪器　高效液相色谱仪：Agilent－1260II（配备紫外检测器）；AUW220D 型十万分之一电子分析天平：岛津国际贸易有限公司，感量 0.00001 g；KH－500E 型数控超声波清洗器：昆山禾创超声仪器有限公司。

1.2　试药　芍药苷标准品：中国食品药品检定研究院，含量 98.7%，批号：Z0281506。黄芪白芍粗提物：河北锦坤动物药业有限公司，批号：20200601，20200602，20200603。乙腈、甲醇、磷酸为色谱纯；乙醇为分析纯；水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　对照品溶液制备　精密称取芍药苷对照品约 10 mg，置 50 mL 量瓶中，加甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀。

2.2　供试品溶液制备　取黄芪白芍粗提物样品摇匀，精密量取 1.0 mL，置 10 mL 量瓶中，加 50% 乙醇稀释至刻度，充分摇匀，静置，取上清液滤过，即得。

2.3　色谱条件　色谱柱为 Agilent ZORBAX SB－C18（4.6 mm × 250 mm，5 μm）；流动相为乙腈－0.1% 磷酸溶液（14∶86）；流速为 1 mL/min；进样量为 10 μL；柱温为 30 ℃；检测波长为 230 nm。对照品与供试品色谱图见下图。

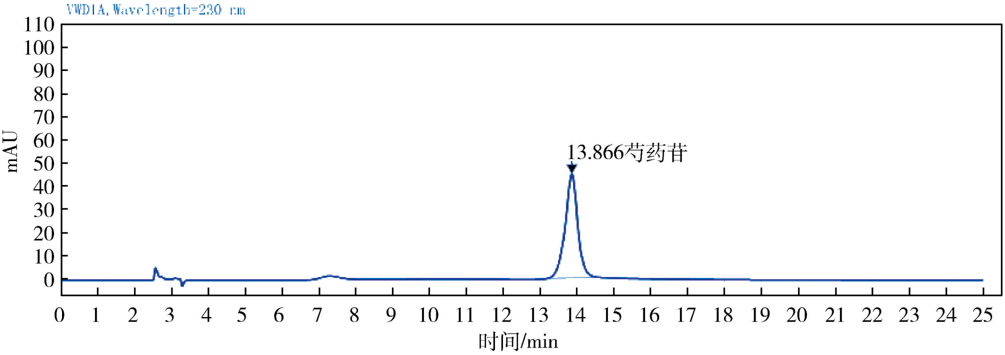

图 1　芍药苷对照品高效液相色谱图

Fig 1　High performance liquid chromatogram of paeoniflorin reference substance

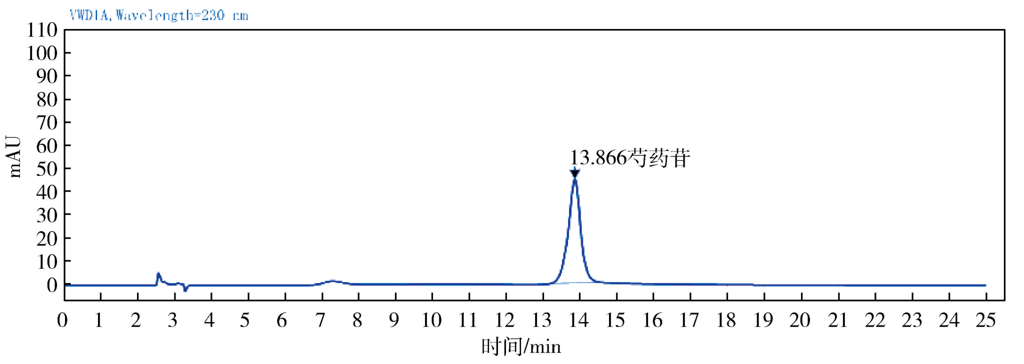

图 2　黄芪白芍粗提物高效液相色谱图

Fig 2　High performance liquid chromatogram of crude extract of Radix Astragali and Radix Paeoniae Alba

2.4　线性关系考察　精密称取芍药苷对照品约 10 mg,置 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,作为储备液。分别精密吸取芍药苷对照品储备液 1、2、3、4、5 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,作为稀释液。照“2.3”项下色谱条件分别进样对照品稀释液和储备液,以峰面积为纵坐标(Y),以对照品含量为横坐标(X)绘制标准曲线,进行线性回归,得芍药苷的回归方程分别为:$Y = 10.6017X - 14.8514$,($r = 0.99966$),结果表明芍药苷在 20 ~ 200 μg/mL 范围内,线性关系良好。结果见图 3。

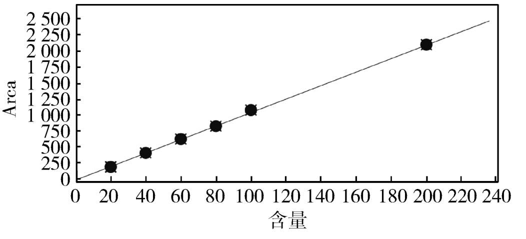

图 3　芍药苷标准曲线

Fig 3　Standard curve of paeoniflorin

2.5　精密度试验　分别精密吸取同一份对照品溶液 10 μL,重复进样 6 次,测定芍药苷峰面积,计算芍药苷峰面积的 *RSD* 为 0.75%,表明仪器精密度良好。结果见表 1。

表 1　精密度试验结果($n = 6$)

Tab 1　Precision test results ($n = 6$)

编号	1	2	3	4	5	6	平均值	*RSD*/%
峰面积	1060.334	1057.404	1074.792	1074.585	1060.040	1071.209	1066.39	0.75

2.6　重复性试验　取同一批产品,精密量取 1 mL,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,平行 6 份,照“2.3”项下色谱条件进行检测分析,测定芍药苷含量,计算芍药苷含量的 *RSD* 为 1.31%,表明该方法重复性良好。结果见表 2。

表 2　重复性试验结果($n = 6$)

Tab 2　Repeatability test results ($n = 6$)

编号	1	2	3	4	5	6	平均值	*RSD*/%
含量($mg \cdot mL^{-1}$)	2.591	2.558	2.528	2.575	2.540	2.619	2.57	1.31

2.7　稳定性试验　精密量取样品 1 mL,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12、24 h 照“2.3”项下色谱条件进行检测分析,测定芍药苷的峰面积,计算其 *RSD* 为 0.62%,表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。结果见表 3。

表 3 稳定性试验结果($n=6$)

Tab 3 Stability test results ($n=6$)

时间/h	0	2	4	8	12	24	平均值	*RSD*/%
峰面积	1351.252	1349.358	1345.642	1342.631	1331.629	1332.483	1342.17	0.62

2.8 回收率试验 取已知含量的样品 9 份,精密量取 1 mL,分成 3 组,每组 3 份,分别按芍药苷的 80%、100%、120% 加入芍药苷对照品溶液,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,照“2.3”项下色谱条件分别进样进行检测分析,计算平均回收率为 101.3%,*RSD* 值为 0.66%。表明该方法测定结果的准确度高。结果见表 4。

表 4 回收率试验结果($n=9$)

Tab 4 Recovery test results($n=9$)

编号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	*RSD*/%
1	2.57	0.16	2.795	102.38		
2	2.57	0.16	2.773	101.58	101.5	0.98
3	2.57	0.16	2.741	100.40		
4	2.57	0.2	2.842	102.60		
5	2.57	0.2	2.810	101.44	102.1	0.58
6	2.57	0.2	2.831	102.20		
7	2.57	0.24	2.809	99.96		
8	2.57	0.24	2.825	100.53	100.4	0.41
9	2.57	0.24	2.831	100.75		

2.9 样品含量测定 取 3 批样品,每批量取 2 份,按“2.3”项下方法制备供试品溶液,照“2.1”项下色谱条件分别进样进行检测分析,记录色谱图,平行进样两次,计算平均含量。各批次样品的含量见表 5。

表 5 样品含量测定结果

Tab 5 Determination results of sample content

生产批号	芍药苷含量/($mg \cdot ml^{-1}$)	*RSD*/%
20200601	2.546	0.51
20200602	2.507	0.52
20200603	2.547	0.55

3 讨论与结论

3.1 流动相的考察[10-14] 试验对甲醇-水、甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液、乙腈-水、乙腈-0.1% 磷酸溶液四种流动相体系进行了考察,结果发现以甲醇-水、甲醇-0.05 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相时出峰时间晚且理论板数太低;以乙腈-水为流动相时对芍药苷的洗脱能力强,出峰时间快,但在供试品中分离度不好,目标峰与杂质峰不易分开;乙腈-0.1% 磷酸溶液对芍药苷的出峰时间及供试品的分离度都有较好的表现。因此本试验选择了乙腈-0.1% 磷酸溶液作为流动相。

3.2 供试品提取溶剂考察 试验对乙醇、甲醇、50% 乙醇、50% 甲醇、乙腈-0.1% 磷酸溶液五种不同提取溶剂进行了考察,结果乙醇、甲醇、乙腈-0.1% 磷酸溶液提取的样品分离度都小于 1.5,达不到要求;用 50% 甲醇提取的样品杂质峰较多,芍药苷含量偏低;而 50% 乙醇作为提取溶剂时,样品杂质峰少,色谱图的分离度最好,芍药苷含量最高。因此本试验选择了 50% 乙醇作为供试品提取溶剂。

3.3 柱温 试验考察了不同柱温对芍药苷色谱峰分离的影响,柱温设置为 25、30、35、40 ℃。柱温为 25 ℃时出峰时间晚且峰型较差;柱温为 40 ℃时出

峰时间快但供试品目标峰与杂质峰的分离效果不理想，分离度小于 1.5；柱温为 30、35 ℃时供试品色谱峰的分离度均符合要求，无明显差异，但考虑柱温太高会对色谱柱造成损害，因此柱温选择 30 ℃。

3.4　结论　采用乙腈 - 0.1% 磷酸溶液为流动相测定植物粗提物中芍药苷的含量，方法易行，结果可靠，为饲料原料及其相关制剂的质量评价和含量检测提供有效方法。

参考文献：

[1] 高业栋，赵新民. 抗生素的滥用现状分析及对策[J]. 医药前沿，2012，34：79 - 80.
Gao Y D，Zhao X M. Analysis and countermeasures of the abuse of antibiotics [J]. Medical frontier，2012，34：79 - 80.

[2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典二〇一五年版二部[S].
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China，Part，Two 2015 Edition [S].

[3] 钟秀会. 兽医中药学[M]. 2 版. 北京：中国科学文化出版社，2006：218 - 219.
Zhong X H. Veterinary Chinese medicine [M]. Two Edition. Beijing：China Science and Culture Press，2006：218 - 219.

[4] 陈四平，张 浩，李相坤，等. 中药白芍的研究进展[J]. 承德医学院学报，2008，25(3)：293 - 296.
Chen S P，Zhang H，Li X K，*et al*. Progress in the study of Radix Paeoniae alba [J]. Journal of Chengde Medical College，2008，25(3)：293 - 296.

[5] 赵强强，韩 丽，潘 媛，等. 黄芪中黄芪多糖含量的测定[J]. 中国现代中药，2011，13(7)：29 - 30.
Zhao Q Q，Han L，Pan Y，*et al*. Determination of astragalus polysaccharide content in Astragalus membranaceus [J]. Chinese Modern Traditional Medicine，2011，13(7)：29 - 30.

[6] 吴 梅，谭 睿. 黄芪多糖研究进展[J]. 川北医学院学报，2013，28(1)：17 - 22.
Wu M，Tan R. Research progress of Astragalus polysaccharide [J]. Journal of North Sichuan Medical College，2013，28(1)：17 - 22.

[7] 杨 莉，王志华，陶建生. 黄芪中黄芪多糖含量测定方法的比较[J]. 中国医药工业杂志，2005，36(9)：562 - 563.
Yang L，Wang Z H，Tao J S. Comparison of determination methods of Astragalus polysaccharide in Astragalus [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Industry，2005，36(9)：562 - 563.

[8] 翟翠云，李晓平，陶 卿. 黄芪多糖含量测定方法的探讨[J]. 广西畜牧兽医，2007，23(1)：7 - 9.
Zhai C Y，Li X P，Tao Q. Discussion on the determination method of Astragalus polysaccharide content [J]. Animal Husbandry and Veterinary of Guangxi，2007，23(1)：7 - 9.

[9] 王华付. 黄芪中黄芪多糖含量的测定[J]. 安徽农业科学，2007，(34)：10948 - 11021.
Wang H F. Determination of astragalus polysaccharide content in Astragalus membranaceus [J]. An hui Agricultural Sciences，2007，(34)：10948 - 11021.

[10] 王爱武，赵雪梅. 高效液相色谱法测定当归散中芍药苷含量[J]. 时珍国医国药，2001，12(5)：404.
Wang A W，Zhao X M. Determination of paeoniflorin in Angelica powder by HIGH performance liquid chromatography [J]. Shi Zhen Chinese medicine，2001，12(5)：404.

[11] 欧阳文轩. 参乌益肾片中芍药苷含量测定的方法学研究[J]. 医药界，2020，(1)：186.
Ou Yang W X. Methodological study on the determination of paeoniflorin content in Shenwuyishen Tablets [J]. The medical world，2020，(1)：186.

[12] 刘延欣，魏会勤. 白芍不同炮制品芍药苷含量测定及其镇痛作用的比较研究[J]. World Latest Medicne Information (Electronic Version)，2018，18(2)：88.
Liu Y X，Wei H Q. Determination of paeoniflorin in different radix Paeoniae alba and Comparative study on its analgesic effect [J]. World Latest Medicne Information (Electronic Version)，2018，18(2)：88.

[13] 张 艳，申丽莎，杨 帆. 赤芍药材中芍药苷含量测定方法的改进[J]. 中国药业，2017，26(24)：28 - 30.
Zhang Y，Shen L S，Yang F. Improvement of determination method of paeoniflorin in Radix Paeoniae Alba [J]. China Pharmaceuticals，2017，26(24)：28 - 30.

[14] 周 哲，孟晓彬，赵 博. HPLC 法测定逍遥汤中芍药苷的含量测定[J]. 贵阳中医学院学报，2019，41(4)：23 - 27.
Zhou Z，Meng X B，Zhao B. HPLC method for the determination of paeoniflorin in Xiaoyao Decoction [J]. Journal of Guiyang University of Chinese Medicine，2017，26(24)：28 - 30.

(编　辑：陈　希)